



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 41 41 178 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 Q 1/68**  
G 01 N 33/68  
C 07 H 21/04  
// C 12N 9/22

②1 Aktenzeichen: P 41 41 178.1  
②2 Anmeldetag: 13. 12. 91  
④3 Offenlegungstag: 17. 6. 93

DE 41 41 178 A 1

⑦1 Anmelder:

Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie  
(EMBL), 6900 Heidelberg, DE

⑦4 Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.  
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,  
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,  
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Böhm, B., Dipl.-Chem.Un-  
iv.  
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦2 Erfinder:

Ansorge, Wilhelm, Dr., 6901 Gaiberg, DE

⑤4 Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren

⑤7 Zur Sequenzierung von Nukleinsäuren sequenziert man zu einer zu sequenzierenden, zumindest teilweise einzelsträngigen Nukleinsäure als Template-Strang mit Hilfe einer geeigneten Polymerase und allen vier Nukleotiden, ausgehend von einem Primer oder einem doppelsträngigen Teilstück, Schritt für Schritt einen Komplementärstrang, wobei man markierte Nukleotide verwendet und führt folgende Schritte durch:

(1) Inkubieren der mit dem Primer versehenen oder teilweise doppelsträngigen Nukleinsäure mit einer Inkubationsmischung, bestehend aus einer Polymerase, einer der vier Nukleotidarten in markierter Form und anderen für die Kettenpolymerisation benötigten Substanzen, wobei ein markiertes Nukleotid in den wachsenden Komplementärstrang eingebaut wird in dem Fall, daß das nächste auf dem Template-Strang vorhandene Nukleotid zu dem verwendeten markierten Nukleotid komplementär ist,

(2) Trennen der gegebenenfalls um ein Nukleotid verlängerten Nukleinsäure von der Inkubationsmischung von Schritt (1) und Durchführung eines oder mehrerer Waschschriffe in an sich bekannter Weise,

(3) Bestimmen des Einbaus eines Nukleotids anhand seiner Markierung, und

(4) falls der Einbau eines markierten Nukleotids erfolgt ist, Entfernen der Markierung, wobei die Schritte (1) bis (4) jeweils cyclisch für alle vier Nukleotidarten durchgeführt werden.

DE 41 41 178 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.

Sequenzierungen von Nukleinsäuren zählen heutzutage in biochemischen Laboratorien zu den täglichen Routineaufgaben. Dabei werden Sequenzierungen normalerweise nach einer der beiden Standardsequenzierungstechniken durchgeführt, nämlich entweder der chemischen Abbaumethode nach Maxam-Gilbert, oder aber der enzymatischen Komplementärstrangsynthesemethode nach Sanger. Gegenwärtig bekannte automatisierte Sequenzierungsmethoden nach der Sanger-Methode verwenden für die Markierung entweder endmarkierte Primer oder aber markierte Terminator-ddNTPs. Bei den Standardsequenzierungstechniken werden die markierten Fragmente auf einem nach der Größe trennenden Medium, z. B. einem Polyacrylamidgel, aufgetrennt und über die Markierung bestimmt. Markierungen sind hierbei radioaktive Markierungen, Fluoreszenzmarkierungen etc. Die Trennkapazität der Gelmatrix limitiert hierbei die Auflösung und die Länge der DNA-Sequenz, welche bestimmt werden kann.

Dem sind mit den bisher bekannten Systemen eindeutig Grenzen gesetzt. Da eben Sequenzierungen jedoch so häufig durchgeführt werden, ist es auf alle Fälle wünschenswert, Verbesserungen gegenüber den bekannten Methoden zu ermöglichen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren bereitzustellen, bei dem auch sehr lange Nukleinsäuresequenzen bestimmt werden können und bei dem auch bereits sehr kleine Mengen an Nukleinsäure zu eindeutigen Ergebnissen führen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, bei dem man zu einer zu sequenzierenden, zumindest teilweise einzelsträngigen Nukleinsäure als Template-Strang mit Hilfe einer geeigneten Polymerase und allen vier Nukleotiden, ausgehend von einem Primer oder einem doppelsträngigen Teilstück, Schritt für Schritt einen Komplementärstrang synthetisiert, wobei man markierte Nukleotide verwendet, und welches folgende Schritte umfaßt:

- (1) Inkubieren der mit dem Primer versehenen oder teilweise doppelsträngigen Nukleinsäure mit einer Inkubationsmischung, bestehend aus einer Polymerase, einer der vier Nukleotidarten in markierter Form und anderen für die Kettenpolymerisation benötigten Substanzen, wobei ein markiertes Nukleotid in den wachsenden Komplementärstrang eingebaut wird in dem Fall, daß das nächste auf dem Template-Strang vorhandene Nukleotid zu dem verwendeten markierten Nukleotid komplementär ist,
- (2) Trennen der gegebenenfalls um ein Nukleotid verlängerten Nukleinsäure von der Inkubationsmischung von Schritt (1) und Durchführung eines oder mehrerer Waschschritte in an sich bekannter Weise,
- (3) Bestimmen des Einbaus eines Nukleotids anhand seiner Markierung, und
- (4) falls der Einbau eines markierten Nukleotids erfolgt ist, Entfernen der Markierung,

wobei die Schritte (1) bis (4) jeweils cyclisch für alle vier Nukleotidarten durchgeführt werden.

Der ganz neue Ansatz, welcher zum erfindungsgemäßen Verfahren geführt hat, liegt darin, daß hier für die Komplementärstrangbildung nur eine Art von Nukleotid und zwar in markierter Form angeboten wird. Ist hier also die nächste auf dem Templatestrang vorliegende Base komplementär zu dem in der Inkubationsmischung vorhandenen markierten Nukleotid, erfolgt der Einbau des Nukleotids mitsamt seiner Markierung durch die Polymerase. Im Rahmen der Erfindung wird als Polymerase eine solche eingesetzt, welche fähig ist, das markierte Nukleotid in den wachsenden Komplementärstrang einzubauen. Abhängig von der Art der zu bestimmenden Nukleinsäure können hier also die bekannten Polymerasen, wie DNA-Polymerase, z. B. T7 DNA-Polymerase, verwendet werden. Als zu bestimmende Nukleinsäuren sind nicht nur DNA-Fragmente, sondern auch RNAs geeignet. Für den Fall, daß nun also ein markiertes Nukleotid eingebaut wird, wird dies über die Markierung festgestellt und damit der Rückschluß auf die komplementäre Base im Templatestrang ermöglicht.

Ist die Base auf dem Templatestrang nicht komplementär zu dem angebotenen markierten Nukleotid, erfolgt kein Einbau und es wird kein Markierungssignal erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird weiterhin durch die nachfolgende Entfernung der Markierung für den Fall, bei dem der Einbau eines markierten Nukleotids stattgefunden hat, gekennzeichnet. Mit "Entfernung der Markierung" ist im Rahmen der Erfindung gemeint, daß die Nukleinsäure in einer Weise behandelt wird, daß das Markierungssignal verschwindet. Dies bedeutet jedoch nicht, daß chemisch eine Abspaltung des markierenden Molekülteils stattfinden muß, es ist u. a. auch eine Bleichung mit einem starken Laser im Fall einer Fluoreszenzmarkierung denkbar (siehe z. B. B. Scalettar et al., Biophys. J. 53, 215 (1988) oder Mathies, R.A. Stryer, L., Single-Molecule Fluorescence Detection: A Feasibility Study using Phycoerythrin. Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences, S. 129—140 (1986) Alan R. Liss, Inc.). Es ist in jedem Fall aber unerlässlich, daß während des Schritts (4) durch die Entfernung der Markierung das markierte Nukleotid nicht chemisch so modifiziert wird, daß die Anpolymerisation des nächsten zum Templatestrang komplementären Nukleotids verhindert wird.

Wird im erfindungsgemäßen Verfahren beispielsweise bei der Bestimmung einer DNA-Sequenz als nächste Base nach dem Primer oder partiellen Doppelstrang markiertes dATP eingebaut, ergibt sich aufgrund des Markierungssignals, welches von dem Kontrollsignal der DNA ohne Markierung abweicht, für den Templatestrang an dieser Position, daß die Base T vorhanden ist. Sind auf dem Templatestrang mehrere gleiche Basen, hier also Thymin, vorhanden, werden im Komplementärstrang entsprechend viele Adenosinmoleküle eingebaut, wodurch sich ein entsprechend stärkeres Markierungssignal ergibt.

Derselbe Schritt, der beispielsweise für das markierte Nukleotid Adenosin in der Inkubationsmischung von Schritt (1) beschrieben wurde, wird aufeinanderfolgend cyclisch für alle Nukleotidarten durchgeführt. So wird für jede Base auf dem Templatestrang letztendlich das komplementäre markierte Nukleotid angeboten, in die Kette eingebaut, wobei aufgrund der Entfernung der Markierung nach jedem entsprechenden Einbau nur jeweils das letzte eingebaute markierte Nukleotid ein Signal erzeugt. Aus diesem Grund ist das Markierungssi-

gnal nicht akkumulativ und die Genauigkeit des Verfahrens sehr groß.

Fig. 1 zeigt mit Hilfe eines Flußdiagramms schematisch den Ablauf des Verfahrens.

Im Rahmen der Erfindung ist es bevorzugt, eine einzelsträngige Nucleinsäure zur Sequenzierung zu verwenden und in 5'-3'-Richtung vor die zu sequenzierende Sequenz ein Oligonukleotid als Primer anzuhybridisieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die zu sequenzierende Nukleinsäure vor Schritt (1) an eine feste Phase gebunden. Dies ermöglicht es, insbesondere in automatisierten Systemen, die Nukleinsäure leicht in die für die verschiedenen Schritte benötigten Lösungen und Mischungen einzutauchen und auch von diesen Lösungen leicht wieder zu trennen.

Es ist dabei wichtig, daß die feste Phase keinen oder nur wenig Background für das Markierungssignal abgibt, z. B. muß, falls Fluoreszenz als Markierung verwendet wird, die feste Phase aus einem Material bestehen, das nicht im selben Wellenlängenemissionsbereich fluoresziert wie die Fluoreszenzmarkierung der verwendeten Nukleotide.

Die Verankerung der Nukleinsäure an der festen Phase kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen, vorzugsweise erfolgt die Verankerung über ein spezifisches Bindepaar, dessen einer Partner mit der festen Phase verbunden ist und dessen anderer Partner an die Nukleinsäure gebunden ist. Besonders bevorzugt wird hier als spezifisches Bindepaar im Rahmen der Erfindung das System Biotin/Avidin oder Biotin/Streptavidin verwendet, wobei wiederum vorzugsweise Avidin bzw. Streptavidin an die feste Phase nach an sich bekannten Methoden gebunden ist und die Nukleinsäure durch Biotin modifiziert ist.

Als feste Phase sind alle Materialien geeignet, die inert gegenüber den Substanzen in den verwendeten Lösungen sind, eine Fixierung der Nukleinsäure erlauben und, wie oben erwähnt, nicht mit der Markierung differieren. Als bevorzugte Beispiele können hier Glas, eine Polymermembran oder Polymer- oder Glaskügelchen, sogenannte beads, genannt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verwendet man anstelle von Nukleinsäuren in an eine Festphase fixierter Form ein Durchflußsystem für die Schritte (1) bis (4), bei dem die Nukleinsäure in Lösung bleibt und mit Hilfe von Filtern und/oder Kapillaren von den jeweils verwendeten anderen Substanzen getrennt wird.

Als Markierung in den Nukleotiden wird im Rahmen der Erfindung vorzugsweise eine Fluoreszenzmarkierung verwendet. Hierbei können insbesondere Fluoreszenzmarkierungen verwendet werden, wie sie in der deutschen Patentanmeldung P 41 25 745 beschrieben sind. Auch die sogenannte "time resolved fluorescence" kann vorteilhaft als Markierung verwendet werden.

Im Rahmen der Erfindung werden als Nukleotide Dideoxynukleotide verwendet. In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung können jedoch auch Dideoxynukleotide oder sogenannte "gefangene" (caged) Nukleotide (s. z. B. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Richard P. Haugland, 1989, Molecular Probes, Inc., Eugene, USA oder Matthews und Kricka, *Analyt. Biochem.* 169, 1 (1988)) verwendet werden. Auch ein Nukleotid erscheint geeignet, bei dem an die 3'-OH-Gruppe der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (Krayevsky A., *BBA*, 1986, 868, S. 136). Hieraus ergibt sich, daß jeweils nur ein Dideoxyri-

bonukleotid o. ä. eingebaut werden kann, da die Polymerase durch diese sogenannten Terminatoren keine Möglichkeit mehr hat, die Kette weiter zu verlängern, auch wenn das der nächsten Base auf dem Templatestrang entsprechende Nukleotid vorhanden ist. Dies bedeutet, daß auch wenn gleiche Basen mehrfach auf dem Templatestrang nacheinander vorkommen, jeweils nur in einem Inkubationsschritt ein Nukleotid eingebaut wird. Dies kann zur Genauigkeit der Methode beitragen. Nach der Bestimmung der Markierung wird das Dideoxynukleotid dann in ein "dNTP-ähnliches polymerisationsverlängerbare Nukleotid" überführt. Die Termination der Komplementärstrangsynthese wird dadurch aufgehoben und der nächste Zyklus der Schritte (1) bis (4) kann erfolgen. Es wird jedoch durch die Verwendung von Dideoxynukleotiden auch ein nochmals vereinfachtes Verfahren ermöglicht, bei dem alle vier Nukleotidarten als Dideoxynukleotide eingesetzt werden, wobei jedoch die vier verschiedenen Dideoxys jeweils auch verschiedene Fluoreszenzmarkierungen aufweisen. Welches der Dideoxynukleotide dann tatsächlich in den wachsenden Komplementärstrang eingebaut wurde, kann in Schritt (3) des erfindungsgemäßen Verfahrens anhand der vorhandenen Markierung festgestellt werden. Diese bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bedeutet daher noch eine wesentliche Arbeitserleichterung und Beschleunigung des Sequenzierungsverfahrens.

Im Rahmen der Erfindung ist es bevorzugt, die Nukleinsäure vor der Sequenzierung zu denaturieren. Des weiteren ist es bevorzugt, jeweils nach Schritt (3) oder (4) mit einem dem verwendeten markierten Nukleotid von Schritt (1) entsprechen den nicht markierten Nukleotid eventuell vorhandenen Lücken im Komplementärstrang aufzufüllen. Auch diese Maßnahme soll die Genauigkeit der Methode noch weiter erhöhen. Da ja natürlich im erfindungsgemäßen Verfahren nicht nur ein Molekül DNA bestimmt wird, sondern derer viele für die Bestimmung und die Erzeugung eines detektierbaren Signals nötig sind, kann es auch vorkommen, daß in manchem Strang der richtige Einbau eines Nukleotids fälschlicherweise unterbleibt. Dann könnte auch in der Folge das wiederum nächste Nukleotid nicht eingebaut werden, diese Nukleinsäuren würden also für die weitere Signalgebung ausfallen. Mit einem nicht markierten Nukleotid werden daher eventuelle Fehlstellen nochmals ausgefüllt, so daß für alle Nukleinsäuren gleiche Ausgangsbedingungen für den nächsten Zyklus der Schritte (1) bis (4) mit dem nächsten Nukleotid gegeben sind.

Bei Verwendung einer Festphasengebundenen Nukleinsäure zur Sequenzierung ist es auch möglich, mehrere und zwar sehr viele Nukleinsäuren gleichzeitig zu bestimmen. Hierzu werden auf eine feste Phase in räumlicher Trennung die zu sequenzierenden Nukleinsäuren verankert und diese gleichzeitig mit den verschiedenen Inkubationsmischungen und Lösungen behandelt. Dabei kann man im verkleinerten Maßstab eine Art Mikrostruktur herstellen und auf einem solchen "DNA-Chip" im Mikromaßstab (siehe Fig. 2) Hunderte bis Tausende von DNA-Proben gleichzeitig sequenzieren. Die DNA kann dabei durch eine Art automatisierte und computergesteuerte Zellenmikroinjektion auf der festen Phase verankert werden. Auch hier sind jedoch alle anderen an sich bekannten Verankerungsarten möglich. Des weiteren kann die Nukleinsäure auch am Boden einer Mikrotrierplatte verankert werden und die Lösungen und In-

kubationsmischungen in die Vertiefungen eingebracht und wieder entfernt werden.

Wie bereits vorher erwähnt, ist es im Rahmen der Erfindung besonders bevorzugt, die Sequenzierung in einem Automaten durchzuführen. Dabei kann zur Bestimmung der Markierung insbesondere eine Charge Coupled Device (CCD) Kamera verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren, welches eine gänzlich neue Technik zur Sequenzierung von DNA darstellt, ohne die Notwendigkeit der Auftrennung auf Agarose- oder Polyacrylamidgelen stellt eine schnelle und äußerst genaue Möglichkeit dar, Nukleinsäuren zu sequenzieren. Bereits die Bestimmung von sehr kleinen Mengen an Nukleinsäuren, um ein vielfaches weniger als bei den bisherigen Methoden, ist möglich, da jedes DNA-Molekül zum Markierungssignal beiträgt, während sich bei den bisherigen Methoden eine statistische Verteilung von Fragmenten und damit für jedes zu bestimmende Nukleotid nur ein Bruchteil der Ausgangsmenge von Nukleinsäuren zur Verfügung steht.

Die Genauigkeit der Methode basiert auf der Tatsache, daß die Extension der polymerisierten Kette unterbrochen wird, sobald das Polymeraseenzym bei einer Base auf dem Templatestrang ankommt, die nicht in der Inkubationsmischung mit den markierten Nukleotiden, mit welcher die Nukleinsäure inkubiert wird, vorhanden ist. Theoretisch kann es zwar zum falschen Einbau einer Base kommen, wodurch sich ein geringes Backgroundsignal ergeben würde, jedoch wird nach dem Markierungsentfernungsschritt (4) auch die falsche Markierung entfernt, weshalb das falsche Signal nicht akkumulieren kann, was die Auflösung nach einigen Zyklen beeinträchtigen könnte. Aus diesem Grund ist der Background im erfindungsgemäßen Verfahren sehr gering und die Genauigkeit der Sequenzbestimmung entsprechend hoch.

Um die Genauigkeit der Sequenzbestimmung nochmals weiter zu erhöhen, kann die zu bestimmende Nukleinsäureprobe in vier Teilproben aufgetrennt werden und dann jeweils alle Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens mit jeweils den vier Nukleinsäurealiquots durchgeführt werden. Die Sequenz wird dann nicht nur über das positive Signal aus der einen Probe bestimmt, in der der Einbau eines markierten Nukleotids stattgefunden hat, sondern auch über das Fehlen eines Signals in den Proben, welche mit den anderen drei markierten Nukleotiden inkubiert wurden.

Zusammenfassend bietet das erfindungsgemäße Verfahren eine schnelle und leicht automatisierbare Möglichkeit, mit großer Genauigkeit die Sequenz von Nukleinsäuren auch bei Vorhandensein nur ganz geringer Mengen derselben zuverlässig festzustellen.

Die folgenden Figuren erläutern die Erfindung weiter:

Fig. 1 zeigt ein Flußschema für das erfindungsgemäße Verfahren.

Fig. 2 zeigt die Anordnung vieler verschiedener Nukleinsäuren, hier DNA-Moleküle, auf einer festen Phase im Mikromaßstab zur gleichzeitigen Prozessierung.

Fig. 3 zeigt die Detektion des Einbaus von Fluorescein-12-dUTP durch Klenow-DNA-Polymerase.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, bei dem man zu einer zu sequenzierenden, zumindest teilweise einzelsträngigen Nukleinsäure

als Template-Strang mit Hilfe einer geeigneten Polymerase und allen vier Nukleotiden, ausgehend von einem Primer oder einem doppelsträngigen Teilstück, Schritt für Schritt einen Komplementärstrang synthetisiert, wobei man markierte Nukleotide verwendet, und welches folgende Schritte umfaßt:

(1) Inkubieren der mit dem Primer versehenen oder teilweise doppelsträngigen Nukleinsäure mit einer Inkubationsmischung, bestehend aus einer Polymerase, einer der vier Nukleotidarten in markierter Form und anderen für die Kettenpolymerisation benötigten Substanzen, wobei ein markiertes Nukleotid in den wachsenden Komplementärstrang eingebaut wird in dem Fall, daß das nächste auf dem Template-Strang vorhandene Nukleotid zu dem verwendeten markierten Nukleotid komplementär ist,

(2) Trennen der gegebenenfalls um ein Nukleotid verlängerten Nukleinsäure von der Inkubationsmischung von Schritt (1) und Durchführung eines oder mehrerer Waschschriffe in an sich bekannter Weise,

(3) Bestimmen des Einbaus eines Nukleotids anhand seiner Markierung, und

(4) falls der Einbau eines markierten Nukleotids erfolgt ist, Entfernen der Markierung,

wobei die Schritte (1) bis (4) jeweils cyclisch für alle vier Nukleotidarten durchgeführt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu sequenzierende Nukleinsäure vor Schritt (1) an einer festen Phase verankert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Verankerung über ein spezifisches Bindepaar erfolgt, dessen einer Partner mit der festen Phase verbunden ist und dessen anderer Partner an die Nukleinsäure gebunden ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als spezifisches Bindepaar das System Biotin/Avidin oder Biotin/Streptavidin verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als feste Phase Glas, eine Polymere membran oder Polymer- oder Glaskügelchen (beads) verwendet.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Primer ein Oligonukleotid vor die zu sequenzierende Sequenz anhybridisiert.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß man für die Schritte (1) bis (4) ein Durchflußsystem verwendet, bei dem die Nukleinsäure in Lösung bleibt und mit Hilfe von Filtern oder/und Kapillaren von anderen Substanzen getrennt wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Markierung der Nukleotide eine Fluoreszenzmarkierung verwendet.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleotide Deoxyribonukleotide verwendet.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleotide Dideoxyribonukleotide verwendet und diese nach erfolgter Bestimmung der Markierung in Schritt (3) oder gegebenenfalls nach Schritt (4) in Deoxyribo-

nukleotid-ähnliche polymerisationsverlängerbare Nukleotide überführt.

11. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man alle vier Nukleotidarten mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen zusammen in einer Inkubationsmischung in Schritt (1) einsetzt und die Unterscheidung der eingebauten Nukleotide über deren Markierung erfolgt.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure vor der Sequenzierung denaturiert.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach Schritt (3) oder (4) mit einem dem verwendeten markierten Nukleotid von Schritt (1) entsprechenden nicht markierten Nukleotid eventuell vorhandene Lücken im Komplementärstrang auffüllt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man auf der festen Phase mehrere zu sequenzierende Nukleinsäuren in räumlicher Trennung voneinander verankert und diese simultan sequenziert.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Schritte (1) bis (3) und gegebenenfalls (4) in einem Automaten durchführt.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Bestimmung der Markierung eine Charge Coupled Device (CCD) Camera verwendet.

---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---

35

40

45

50

55

60

65

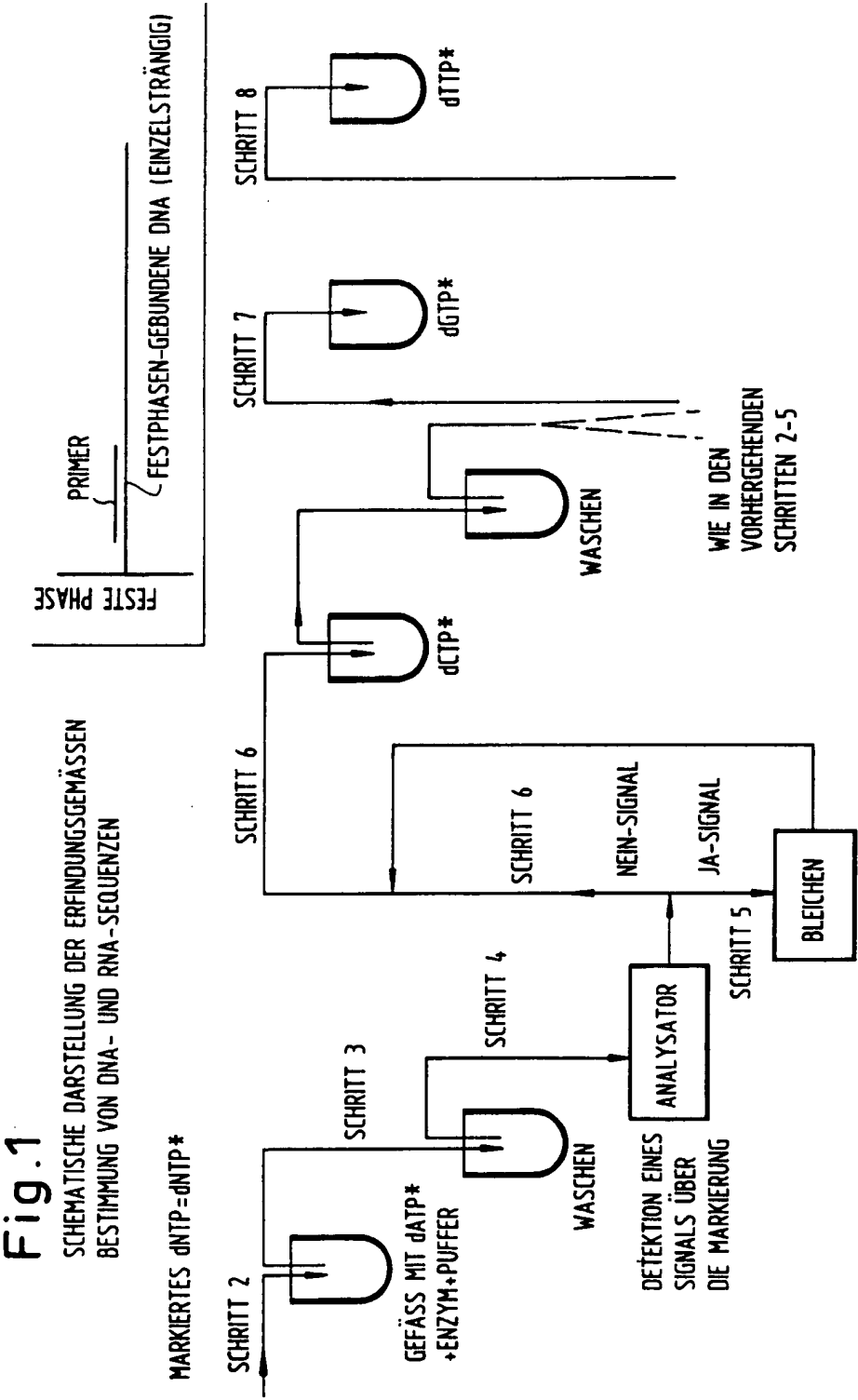
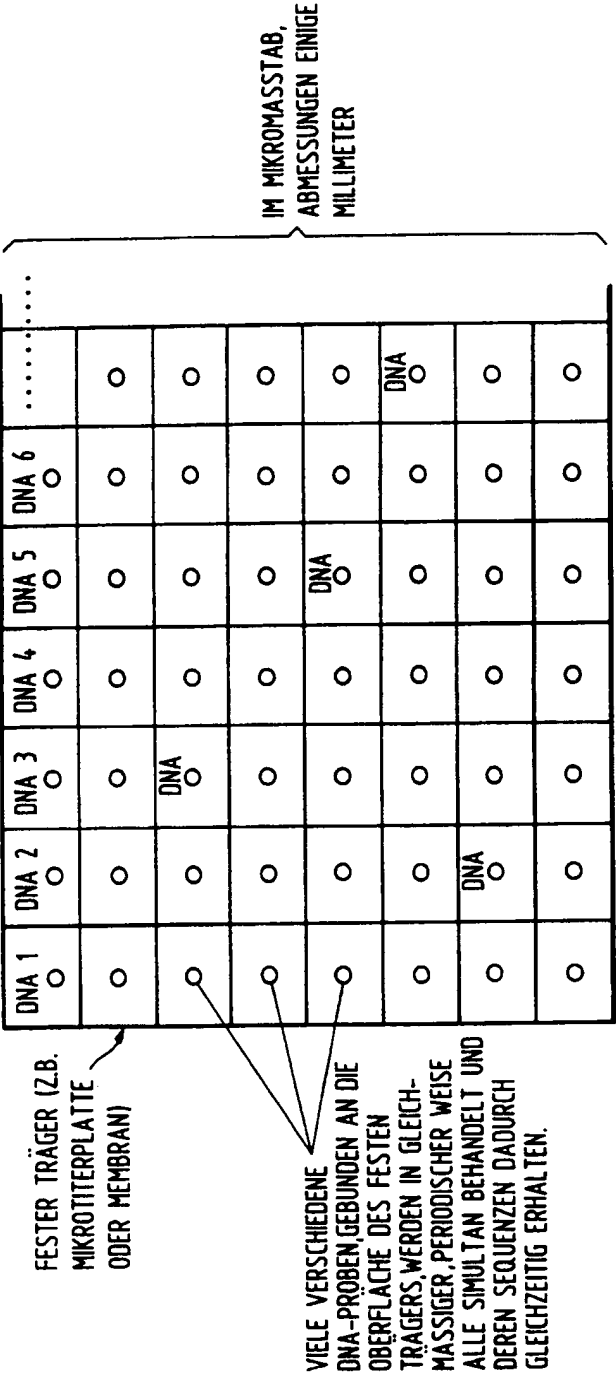
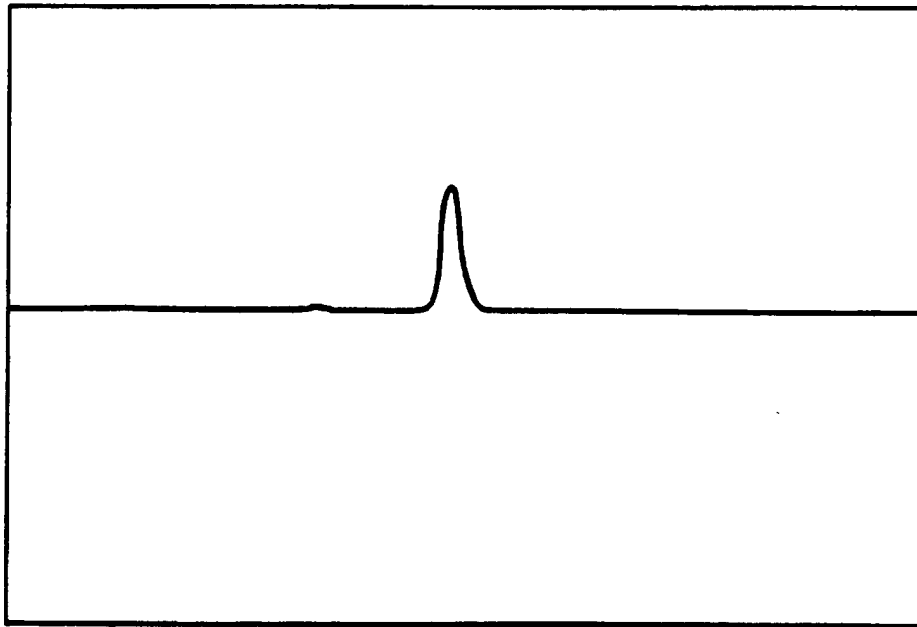


Fig. 2  
GLEICHZEITIGE BEHANDLUNG (SEQUENZIERUNG) VERSCHIEDENER (VIELER HUNDERTER) DNA-PROBEN,  
INSBESONDERE IM MIKROMASSTAB.



## Fig.3

ENZYMATISCHER EINBAU VON FLUORESCEIN-12-dUTP  
DURCH KLENOW-DNA-POLYMERASE DETEKTIERT WERDEN  $\sim 10^{-17}$  MOL  
DES MARKIERTEN DNA-FRAGMENTS





## Description of DE 4141178 (A1)

The invention relates to a method to the sequencing of nucleic acids.

Sequencings of nucleic acids rank nowadays in biochemical laboratories among the daily tasks of routine. Sequencings become normally i.e. either the chemical dismantling method after Maxam Gilbert, or however after one of the two Standardsequenzierungstechniken performed, the enzymatic complementary strand synthesis method after singer. Current known automated Sequenzierungsmethoden after the singing he method uses finallabeled primers for the mark either or but labeled terminator ddNTPs. With the Standardsequenzierungstechniken the labeled fragments on Mediums separating according to the size become, z. B. a polyacrylamide gel, separated and over the mark certain. Marks are here radioactive labels, fluorescence markings etc. The separation capacity that gel matrix limited here the resolution and the length of the DNA sequence, which certain can become.

That are with that so far prior art systems unique boundaries set. Since planar sequencings become however so frequent performed, it is in any case desirable to make improvements possible against the known methods.

Object of the instant invention is it to make a method available to the sequencing of nucleic acids with which also very prolonged nucleic acid sequences certain to become to be able and with also already much small amounts at nucleic acid to unique results lead.

Dissolved one becomes this object by the invention process the sequencing of nucleic acids to sequenzierenden with one one at least partial einzelsträngigen nucleic acid than Template strand with the help of a suitable polymerase and all four nucleotides, on the basis of a primer or a double stranded section, step by step a complementary strand synthesized, whereby one labeled nucleotides used, and which subsequent steps covers:

- (1) Incubation of the double stranded nucleic acid with a Inkubationsmischung, existing from a polymerase, one of the four kinds of nucleotide in labeled form and other substances, required provided with the primer, partial or, for the chain polymerization, whereby a labeled nucleotide becomes incorporated into the increasing complementary strand in the case that the next nucleotide present on the Template strand is more complementary to the used labeled nucleotide,
- (2) Separate the nucleic acid if necessary extended around a nucleotide from the Inkubationsmischung of step (1) and execution or several washing steps into actual known manner,
- (3) Determine the installation of a nucleotide on the basis its mark, and
- (4) if the incorporation of a labeled nucleotide is made, removal of the mark, whereby the steps (1) to (4) cyclic in each case for all four kinds of nucleotide performed become.

That whole new approach, which to the invention process guided has, lies in the fact that becomes offered for the complementary strand formation only a type of nucleotide in labeled form here. Here thus the next base present on the Templatestrang is more complementary to in the Inkubationsmischung present labeled nucleotide, the made incorporation of the nucleotide with its mark by the polymerase. In the scope of the invention such used as polymerase, which capable is to build the labeled nucleotide into the increasing complementary strand, become. Dependent ones of the type of the nucleic acid which can be

determined know here thus the known polymerases, like DNA polymerase, z. B. T7 DNA polymerase, used become. As nucleic acids which can be determined not only DNA fragments, but also RNAs are suitable. If now thus a labeled nucleotide becomes incorporated, this over the mark found and thus the conclusion on the complementary base in the Templatestrang become possible.

The base on the Templatestrang is not not more complementary obtained to the offered labeled nucleotide, made incorporation and it becomes no marker signal.

The invention process becomes further characterized by the subsequent removal of the mark for the case, at which the incorporation of a labeled nucleotide took place. With "removal of the mark" meant is in the scope of the invention that the nucleic acid becomes in a manner treated that the marker signal disappears. This however not that a chemical cleavage of the marking molecule part must take place, it is meant and. A. also a bleaching with a strong laser in the case of a fluorescence marking more conceivable (see z. B. B. Scalettar et al., Biophys. J. 53, 215 (1988) or Mathies, R.A. Stryer, L., single Molecule Fluorescence Detection: A feasibility Study using phycoerythrin. Applications OF Fluorescence into the Biomedical Sciences, S. 129-140 (1986) Alan R. , Inc. let.). It is however essential in each case that does not become chemical so modified during the step (4) by the removal of the mark the labeled nucleotide that the Anpolymerisation of the next nucleotide complementary to the Templatestrang becomes prevented.

If labeled dATP incorporated becomes in the invention process for example with the determination of a DNA sequence as next base after the primer or partial duplex, it results due to the marker signal, which deviates from the check signal of the DNAs without mark, for the Templatestrang at this position that the base is T present. If several same bases, here thus Tymidin, are present on the Templatestrang, corresponding many adenosine molecules become incorporated in the complementary strand, whereby a corresponding stronger marker signal results.

The same step, which became for example for the labeled nucleotide adenosine in the Inkubationsmischung of step (1) described, becomes consecutive cyclic performed for all kinds of nucleotide. Thus finally the complementary labeled nucleotide becomes offered, into the chain incorporated for each base on the Templatestrang, whereby due to the removal of the mark after each corresponding incorporation only in each case the last incorporated labeled nucleotide a signal generated. From this reason the marker signal is not akkumulativ and the accuracy of the method very large.

Fig. 1 shows the schematic expiration of the method with the help of a flow diagram.

In the scope of the invention it is preferred to use a einzelsträngige nucleic acid for the sequencing and in 5 min -3 mi direction before the too sequenzierende sequence an oligonucleotide as primer anzuhybridisieren.

In a preferable embodiment of the invention the too sequenzierende nucleic acid before step (1) becomes bound to a solid phase. This possible it, in particular in automated systems to immerse and also from these solutions light again separate the nucleic acid light in the solutions and mixtures required for the different steps.

It is thereby important that the solid phase does not deliver or only little Background for the marker signal, z. B. , if fluorescence becomes used as mark,

the solid phase must consist of a material, which does not fluoresce within the same wavelength emission range as the fluorescence marking D of used nucleotides.

The anchorage of the nucleic acid at the solid phase can be made after actual known methods, the preferably made anchorage by a specific pair of binding, whose is partner with the solid phase a linked and whose is other partner to the nucleic acid bound. Particularly preferred becomes here as specific pair of binding in the scope of the invention the system Biotin/Avidin or Biotin/Streptavidin used, whereby again preferably avidin and/or Streptavidin to the solid phase after actual known methods bound is the nucleic acid by biotin modified is.

When solid phase are all materials suitable, which are inert opposite the substances in the used solutions, a fixation to the nucleic acid permit and, how mentioned above differs, not with the mark. As preferable examples can become glass, a polymer membrane or a polymere or a glass bead, so called beads, mentioned here.

In an other preferable embodiment of the invention used one in place of nucleic acids in to a solid phase fixed form a flow system for the steps (1) to (4), with which the nucleic acid remains in solution and by filters and/or capillaries of the used in each case other substances separated becomes.

As mark in the nucleotides a fluorescence marking becomes preferably used in the scope of the invention. Here can in particular fluorescence markings used become, as they are in the German patent application P 41 25 745 described. Also the so called "time resolved fluorescence" can become favourable as mark used.

In the scope of the invention Deoxyribonukleotide become used as nucleotides. In an other preferred aspect of the invention however also Dideoxyribonukleotide or so called "caught" (caged) nucleotides (S. can. z. B. Handbook OF fluorine cent Probes and Research chemicals, smelling pool of broadcasting corporations P. Haugland, 1989, Molecular Probes, Inc., Eugene, the USA or Matthews and Kricka, Analyt.Biochem. 169, 1 (1988)) used become. Also a nucleotide appears suitable, with to the 3' min OH group the fluorescent dye coupled is (Krayevsky A., BBA, 1986, 868, S. 136). From this it results that only in each case a Dideoxyribonukleotid o. A. incorporated will can, since the polymerase has the possibility more by these so called terminators to extend the chain more other even if that is the next base on the Templatestrang corresponding nucleotide present. This meant that even if same bases seem to multiple on the Templatestrang successively in each case only in a Inkubationsschritt a nucleotide incorporated becomes. This can contribute to the accuracy of the method. After the determination of the mark the Dideoxynukleotid becomes then transferred into a "dNTP similar polymerization-extendable nucleotide". The termination of the complementary strand synthesis will via it canceled and the next Cycle of the steps (1) to (4) can take place. It becomes however by the use of Dideoxyribonukleotiden also again a simplified process possible, used with which all four kinds of nucleotide become as Dideoxyribonukleotide, whereby however the four different Dideoxys exhibit also in each case different fluorescence markings. Which became the Dideoxynukleotide then actual into the increasing complementary strand incorporated, found can become in step (3) of the invention process on the basis the present mark. This preferable embodiment of the invention process means therefore still another a substantial facilitation of work and acceleration of the Sequenzierungsverfahrens.

In the scope of the invention it is preferred, the nucleic acid before the sequencing to be denatured. The other it is preferred, in each case after step (3) or (4) with the used labeled nucleotide of step (1) the not labeled nucleotide eventually present gaps in the complementary strand to be filled correspond. Also this measure is to increase the accuracy of the method still more other. Since natural in the invention process becomes not only a molecule DNA certain, but those many for the determination and the generation of a detectable signal necessary are, can there also occur that in some strand the proper incorporation of a nucleotide is falsely omitted. Then the again next nucleotide could not become incorporated, these nucleic acids for the other signalling would thus fail also in the sequence. With a not labeled nucleotide become again filled therefore eventual defects, so that for all nucleic acids same initial conditions for the next Cycle of the steps (1) to (4) with the next nucleotide given are.

With use of a solid-phase-bound nucleic acid to the sequencing it is also possible to determine several a great many nucleic acids simultaneously. For this sequencing nucleic acids the anchored and these simultaneous with the different incubation mixtures and solutions become treated on a solid phase in spatial separation. One can manufacture a type microstructure in the reduced yardstick and on such a "DNA chip" in the micro yardstick (SI Fig. 2) Hundreds to thousands of DNA samples simultaneously sequence. The DNAs thereby automated and computer controlled cell micro injection on the solid phase anchored can become by a type. Also here however all other actual known kinds of anchorage are possible. The other the nucleic acid can become also at the soil of a microtiter plate anchored and become the solutions and incubation mixtures the recesses introduced and again remote.

Like already before mentioned, it is particularly preferred in the scope of the invention to accomplish the sequencing in a machine. In particular a batch coupled LED DEVICE (CCD) can become camera used the determination of the mark.

The invention process, which one completely represents new technique to the sequencing of DNA, without the need of the separation on agarose or Polyacrylamide gels represents a rapid and extremely precise possibility, nucleic acids to sequence. Already the determination of very much small amounts at nucleic acids, over a multiple less than with the prior methods, is possible, since each DNA molecule contributes to the marker signal, while with the prior methods a statistical distribution of fragments of the nucleic acid stands itself and thus for everyone nucleotide only a fraction of the output quantity of nucleic acids is order, which can be determined.

Accuracy method based on fact that extension polymerized chain interrupted becomes, as soon as polymerase enzyme with base on Template strand arrives, which is not in the incubation mixture with the labeled nucleotides, with which the nucleic acid is incubated, present. Theoretical one can come it to the incorrect incorporation of a base, whereby a small Background signal would result, however becomes to the marking distance step (4) also the incorrect mark remote, why the incorrect signal cannot accumulate, which could impair the resolution after some Cycles. From this reason the Background is very small in the invention process and the accuracy of the sequence regulation corresponding high.

In order to increase the accuracy of the sequence regulation again more other, the nucleic acid sample in four sub-samples, which can be determined, can become separated and become in each case then all steps of the invention process with in each case the four nucleic acid aliquots performed. But also the sequence took place then not only over the positive signal from sample a certain,

in that the incorporation of a labeled nucleotide over the absence of a signal in the samples, which were inkubiert with the other three labeled nucleotides.

In summary the invention process offers a rapid and light automizable possibility to determine with high accuracy the sequence of nucleic acids also with presences of only whole small amounts the same reliable.

The subsequent figs continue to describe the invention:

Fig. 1 shows a river pattern for the invention process,

Fig. the array of many different nucleic acids, here DNA molecules, points 2 on a solid phase in the micro yardstick to the simultaneous processing.

Fig. the detection of the installation of Fluorescein-12 shows 3 dUTP by Klenow DNAPolymerase.

### Claims of DE 4141178 (A1)

1. Method to the sequencing of nucleic acids to sequenzierenden with one to one at least partial einzelsträngigen nucleic acid than Template strand with the help of a suitable polymerase and all four nucleotides, on the basis of a primer or a double stranded section, step by step a complementary strand synthesized, whereby one labeled nucleotides used, and which subsequent steps covers:

- (1) Incubation of the double stranded nucleic acid with a Inkubationsmischung, existing from a polymerase, one of the four kinds of nucleotide in labeled form and other substances, required provided with the primer, partial or, for the chain polymerization, whereby a labeled nucleotide becomes incorporated into the increasing complementary strand in the case that the next nucleotide present on the Template strand is to the used labeled nucleotide komplementär,
- (2) Separate the nucleic acid if necessary extended around a nucleotide from the Inkubationsmischung of step (1) and execution or several washing steps into actual known manner,
- (3) Determine the installation of a nucleotide on the basis its mark, and
- (4) if the incorporation of a labeled nucleotide is made, removal of the mark,

whereby the steps (1) to (4) cyclic in each case for all four kinds of nucleotide performed become.

2. Process according to claim 1, characterised in that the too sequenzierende nucleic acid before step (1) at a solid phase anchored becomes.

3. Process according to claim 2, characterised in that the anchorage over a specific pair of binding made, whose is partner with the solid phase a linked and whose is other partner to the nucleic acid bound.

4. Process according to claim 3, characterised in that one as specific pair of binding the system Biotin/Avidin or Biotin/Streptavidin used.

5. Process according to one of claims 2 to 4, characterised in that one as solid phase glass, a polymer membrane or a polymere or a glass bead (beads) used.

6. Verfahren after one of the preceding claims, characterised in that one as primer an oligonucleotide before the too sequenzierende sequence anhybridisiert.

7. Process according to claim 1 or 6, characterised in that one for the steps (1) to (4) a flow system used, with which the nucleic acid remains in solution and by filters and/or capillaries of other substances separated becomes.

8. Method after one of the preceding claims, characterised in that one as mark of the nucleotides a fluorescence marking used.

9. Method after one of the preceding claims, characterised in that one as nucleotides Deoxyribonukleotide used.

10. method after one of the claims 1 to 8, characterised in that one as nucleotides Dideoxyribonukleotide used and this after made determination of the mark in step (3) or if necessary after step (4) into Deoxyribonukleotid similar polymerization-extendable nucleotides transferred.

11. Process according to claim 11, characterised in that one all four kinds of nucleotide with different in each case fluorescence markings together in a Inkubationsmischung in Sch (1) uses and the distinction of the incorporated nucleotides over their mark made.

12. Method after one of the preceding claims, characterised in that one the nucleic acid before the sequencing denatured.

13. Method after one of the preceding claims, characterised in that one after step (3) or (4) with the used labeled nucleotide a not labeled nucleotide eventual present gaps in the complementary strand, corresponding of step (1), fills up.

14. Process according to one of claims 1 to 6 and 8 to 13, characterised in that one on the solid phase several to sequenzierende nucleic acids in spatial separation from each other anchored and these simultaneous sequenziert.

15. If necessary method after one of the preceding claims, characterised in that one the steps (1) to (3) and (4) in a machine accomplishes.

16. Method after one of the preceding claims, characterised in that one to the determination of the mark a batch coup LED DEVICE (CCD) Camera used.